

論文内容の要旨

Human exosomal placenta-associated *miR-517a-3p* modulates the expression of *PRKG1* mRNA
in Jurkat cells

(訳) エクソソーム中のヒト胎盤特異的 *miR-517a-3p* は Jurkat 細胞において *PRKG1* の発現を
調節している

日本医科大学大学院医学研究科 女性生殖発達病態学分野
大学院生 神戸沙織

Biology of Reproduction (2014)掲載予定

【目的】

エクソソーム(exosome)は多胞体に由来する直径 30-100 nm の小胞であり、様々なヒト細胞から細胞外(血液などの体液中)に放出されている。最近では、エクソソームはタンパク質、核酸や脂質を含み、起源となる細胞から隣接する細胞や離れた細胞に輸送され、レシピエント細胞の生物学的機能に影響を与えていると考えられている。また、近年、エクソソームにはマイクロ RNA(miRNA)も含まれていることが明らかになっている。miRNA はタンパク質をコードしない約 22 塩基の RNA で、標的遺伝子の非翻訳領域である 3'-UTR に結合してその発現を抑制する。

19 番染色体上の miRNA クラスター由来の miRNA(C19MC-miRNA)は、ヒトでは 46 種類が同定されており、特に胎盤で特異的に発現している miRNA(胎盤特異的 miRNA)であるが、胎盤や妊娠における機能は不明のままである。これまでに我々は胎盤特異的 miRNA がヒト胎盤の絨毛栄養膜細胞に発現し、エクソソームを介して母体血中に放出されていることを明らかにしている。エクソソーム中の miRNA は循環血液中で安定に存在しているため、妊娠母体中で母体細胞に取り込まれ機能していることが推察される。そこで、胎盤特異的 miRNA が胎盤栄養膜細胞から母体免疫細胞にエクソソームを介して輸送され、母体免疫細胞(レシピエント細胞)の標的遺伝子を制御していると仮説を立て、実験を行った。

【方法】

miRNA がエクソソームを介して胎盤栄養膜細胞から母体末梢血免疫細胞に輸送される可能性を調べるため、培養細胞を用いた *in vitro* モデル実験を行った。BeWo 細胞(栄養膜細胞モデル)の培養液上清から超遠心法でエクソソーム(BeWo エクソソーム)を分離した。BeWo エクソソームを Jurkat 細胞(免疫細胞モデル)に添加し 24 時間培養し、リアルタイム PCR 法で BeWo エクソソーム由来の胎盤特異的 miRNA である *miR-517a-3p* の検出を行った。また、レシピエント細胞である Jurkat 細胞における *miR-517a-3p* の標的遺伝子候補を調べるため、Jurkat 細胞に *miR-517a-3p* を過剰発現させて DNA マイクロアレイ解析を行った。引き続き、マイクロアレイ解析から見出された標的遺伝子候補について、ルシフェラーゼアッセイなどを用いて真の標的候補であるか検証実験を行った。

次に、妊娠中の母体免疫細胞に胎盤特異的 miRNA が取り込まれているか末梢血免疫細胞を用いた *in vivo* 実験を行った。倫理委員会の承認を得た後、妊婦免疫細胞(ナチュラルキラー細胞[NK 細胞]、制御性 T 細胞[Treg 細胞])における *miR-517a-3p* の取り込みをリアルタイム PCR にて測定した。さらに、末梢血免疫細胞がエクソソームを取り込むことが出来るか、分離末梢血免疫細胞に BeWo エクソソームを添加後 24 時間培養し、リアルタイム PCR にて *miR-517a-3p* の検出を試みた。

【結果】

BeWo 細胞の培養液上清から分離した小胞は、エクソソームのマーカーである CD63、CD81、

TSG101 が陽性の直径約 85 nm の小胞であり、エクソソームの特徴を有した小胞であった。また、リアルタイム PCR 法で小胞中に BeWo 細胞由来の *miR-517a-3p* が検出できた。

レシピエント細胞である Jurkat 細胞は *miR-517a-3p* を発現していないが、BeWo エクソソーム添加・培養後の Jurkat 細胞で検出が可能であった。さらに、BeWo エクソソーム添加・培養した Jurkat 細胞をトリプシン様酵素 TrypLE で細胞表面を処理したが、非処理の細胞と比較して *miR-517a-3p* の発現に差を認めなかった。よって、*miR-517a-3p* が BeWo エクソソームを介して Jurkat 細胞に取り込まれることが示された。

Jurkat 細胞に合成 *miR-517a-3p* をトランスフェクションし、過剰発現させて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、発現低下した遺伝子から、*miR-517a-3p* の標的遺伝子候補として *protein kinase, cGMP-dependent, type I (PRKG1)* を見出した。*miR-517a-3p* を過剰発現させた Jurkat 細胞において、mRNA および蛋白レベルで *PRKG1* の発現が有意に抑制された。さらに、*PRKG1* の 3'-UTR ルシフェラーゼアッセイを行い、特異的にルシフェラーゼが抑制されたことより、*PRKG1* が *miR-517a-3p* の標的遺伝子で有ることを見出した。さらに、BeWo エクソソーム添加・培養 Jurkat 細胞において *PRKG1* の発現は有意に抑制された。以上より、培養細胞を用いた in vitro モデル実験において、*miR-517a-3p* がエクソソームを介してレシピエント細胞に取り込まれ、標的遺伝子の発現を調節することが可能であることを明らかにした。

次に、妊婦末梢血 NK 細胞と Treg 細胞について胎盤特異的 miRNA の検出を行ったところ、NK 細胞において分娩前に *miR-517a-3p* が検出され、分娩後 4 日目には速やかにクリアランスされた。さらに、*PRKG1* の発現は分娩前と比較して、分娩後 4 日目に有意に上昇し、*miR-517a-3p* の検出と逆相関することを見出した。Treg 細胞では分娩前後で明らかな差を認めなかった。

【考察】

栄養膜細胞のモデルである BeWo 細胞の胎盤特異的 miRNA *miR-517a-3p* は、エクソソームを介して免疫細胞のモデルである Jurkat 細胞に取り込まれ、細胞内の標的遺伝子である *PRKG1* の発現を調節出来ることを明らかにした。さらに、分娩前後の妊婦末梢血 NK 細胞における *miR-517a-3p* と *PRKG1* の発現が逆相関することから、胎盤由来のエクソソームを介して母体 NK 細胞に miRNA が取り込まれ、その内在性遺伝子を修飾することが示唆された。今回、Jurkat 細胞において *miR-517a-3p* の標的遺伝子として、一酸化窒素/cGMP シグナル経路における鍵となるメディエーターである *PRKG1* をコードしている遺伝子を同定したが、NK 細胞における *PRKG1* の機能、*PRKG1* 以外の NK 細胞における妊娠維持機能に関与する標的遺伝子は不明であり、今後の課題として残された。今回の研究により、エクソソーム由来の miRNA を介した胎盤-母体免疫細胞コミュニケーションの存在が示唆され、妊娠維持機構解明に役立つ新たな知見を提供することが出来た。